

【3】

氏 名	橋 本 智 久 <small>はし もと とも ひさ</small>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第768号
学位授与の日付	令和2年10月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (先端外科学)
学位論文題目	Effect of the Cell Alive System on nerve tissue cryopreservation (神経凍結保存におけるCell Alive Systemの効果)
論文審査委員	(主査) 教授 種 市 洋 (副査) 教授 長 田 伝 重 教授 上 田 秀 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

細胞凍結保存で問題となるのが細胞死につながる細胞内外の氷晶形成である。磁場付加できるprogram freezer (Cell Alive System以下CAS[®]) は凍結時の氷晶形成を磁場で抑制し、viabilityを有した細胞凍結保存を可能とした。今回、このCAS[®]を用いてviabilityを保った神経組織の凍結保存を可能とする最適プログラムを見出す為の実験を行った。

【目 的】

CASを用いて神経凍結保存の最適プログラムを見出すこと。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針にしたがって行った。吸入麻酔下にてWistar系ラット（体重250～300g）の坐骨神経1～2cm採取し、凍結保護液（セルバンカー[®]）に浸漬後凍結実験を行った。第一実験として、凍結最低温度を-50℃とし、予備冷却設定の有無、磁場付加（CAS）の有無、凍結速度、解冻方法を変え組織観察し最適条件を検討した。第二実験では第一実験の設定温度で、磁場環境（磁場強度・変化率）設定を変化させ細胞培養を行い細胞生存率（凍結後坐骨神経/新鮮坐骨神経の細胞培養数×100）とし凍結解冻時の磁場環境を評価した。第三実験では、移植実験としてWistar系ラット（8～9週齢体重250～300g）の坐骨神経を1cm採取し、凍結解冻せずにそのまま対側肢に移植したものをコントロール群、CAS凍結解冻後対側肢に移植した群（CAS+）、CASなし凍結解冻後対側肢に移植した群（CAS-）とした。それらを移植後2.48週で採取した。組織

学的評価として、HE染色、抗S100抗体を用いた蛍光染色、前脛骨筋の筋湿重量を計測した。蛍光染色において、移植神経のシュワン細胞数を神経1本に対し5か所（in regions of interest (ROI) 1.5×1.5mm, 20ROIs）を計測した。群間比較は分散分析を用い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

【結 果】

第一実験では、磁場付加下に機械の最大速度で凍結・解凍、氷晶形成帯前後に予備冷却を設定する事によって組織破壊が少なかった。第二実験では、統計学的有意差は生じなかったが、強度29.6V変化率60Hzの磁場状態が生存率27.81%と最も高かった。第三実験では、前脛骨筋湿重量は移植後8週において統計学的有意差を認めなかった（ $P=0.0981$ ）が、コントロール群とCAS+群において増加していた。また、坐骨神経の蛍光染色においては4.8週のCAS+がCAS-と比べ、シュワン細胞は増加、残存しており、4週において有意差を生じた。（ $P=0.0015$ ）

【考 察】

凍結保存において問題となるのが、細胞内外の氷晶形成である。0～-5℃の氷晶形成帯を通過する速度に関わらず細胞内外に氷晶形成を生じると細胞死を生じる。これに対しCAS[®]は磁場による振動によって氷晶形成を抑制すると報告されており、歯科領域の歯根膜細胞、歯髄組織や神経幹細胞の凍結保存において成果があげられている。また、細胞死につながる氷晶形成は、氷晶形成帯を通過する速度が遅いと氷晶の体積が増大すると考えられている。幹細胞レベルではあるが、凍結時に磁場を付加させるだけでなく、解凍時にも磁場付加することによって氷晶形成、再氷晶形成が抑制され良好な成績も報告されている。これらを踏まえ実験を行い、強度29.6V変化率60Hzの磁場状態で氷晶形成帯の前後に予備冷却を設定し、氷晶形成帯の通過速度を上げ、凍結・解凍に磁場付加することによって、細胞内外の氷晶形成、再氷晶形成を抑制する凍結プログラムとなった。第三実験の移植実験では、前脛骨筋の筋湿重量が、8週においてコントロールと同等に増加していた。また、移植後4.8週においてCAS+の蛍光染色は、CAS-と比べ移植部のシュワン細胞が明らかに増加しており細胞生存を有した凍結保存が、有用であった。しかし、生存率が全体的に低く、これらは細胞培養のコラゲナーゼの影響を神経細胞では受けやすいものと考えられた。この様に最適な凍結技術開発における研究では不確定要素が多く、今後は組織凍結に適した保存液・viabilityの評価法、更なる周波数増加と高速での凍結可能な冷蔵庫の開発も必要と考えられた。

【結 論】

CAS[®]を用いてviabilityを保った神経組織の凍結保存を可能とするCAS凍結の最適プログラムを見出す実験を行った。氷晶形成帯の前後に予備冷却を設定し、氷晶形成帯の通過速度を上げ、凍結・解凍両方に磁場付加することが細胞内外の氷晶形成、再氷晶形成を抑制する凍結プログラムであった。また、凍結磁場の強度、変化率をそれぞれ変化させ細胞培養の生存率で評価した。細胞培養の変化率では強度3（29.6V）変化率10（60Hz）の磁場状態が生存率27.81%と最も高く磁場強度と変化率の設定は最適と考えられた。移植実験では4.8週での前脛骨筋の筋湿重量の増加、シュワン細胞の増加も認められ、磁場下での凍結解凍が有用であった。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

凍結保存において問題となるのが、細胞内外の氷晶形成である。0～-5℃の氷晶形成帯を通過する速度に関わらず細胞内外に氷晶形成を生じると細胞死を生じる。これに対しCell alive system（以下CAS）は、磁場による振動によって氷晶形成を抑制すると報告されており、歯科領域の歯根膜細胞、歯髄組織や神経幹細胞の凍結保存において成果があげられている。また、細胞死につながる氷晶形成は、氷晶形成帯を通過する速度が遅いと氷晶の体積が増大すると考えられている。幹細胞レベルではあるが、凍結時に磁場を付加させるだけでなく、解凍時にも磁場付加することによって氷晶形成、再氷晶形成が抑制され良好な成績も報告されている。これらを踏まえ実験を行い、強度29.6V変化率60Hzの磁場状態で氷晶形成帯の前後に予備冷却を設定し、氷晶形成帯の通過速度を上げ、凍結・解凍に磁場付加することによって、細胞内外の氷晶形成、再氷晶形成を抑制する凍結プログラムとなった。移植実験では、前脛骨筋の筋湿重量が、8週においてコントロールと同等に増加していた。また、移植後4.8週においてCAS+の蛍光染色は、CAS-と比べ移植部のシュワン細胞が明らかに増加しており細胞生存を有した凍結保存が有用であった。しかし、生存率が全体的に低く、これらは細胞培養のコラゲナーゼの影響を神経細胞では受けやすいものと考えられた。この様に最適な凍結技術開発における研究では不確定要素が多く、今後は組織凍結に適した細胞生存の評価法、更なる周波数増加と高速での凍結可能なフリーザーの開発も必要と結論づけた。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、凍結解凍後の神経組織を光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて調査した。また、神経細胞培養を行い、シュワン細胞数を測り生存率を算出し調査した。詳細なデータ収集と妥当な統計解析を実施しており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

CASを用いた神経凍結保存の研究はなく、この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、組織学的評価と統計手法を用いて結論を導き出しており、論理的に矛盾するものではなく妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、CASを用いた初めての神経凍結保存の論文である点で有意義な報告である。本結果は、神経凍結保存により神経移植治療に携わる整形外科医・手外科医にとっても重要かつ有意義な情報であると評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、整形外科・手外科を学び臨床経験した上で、研究仮説に基づき、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Cell and Tissue Banking

(21 : 139-149, 2020)